

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



Influência da temperatura da irrigação ultrassónica passiva no efeito bactericida do Hipoclorito de Sódio a 5,25% contra a *Enterococcus faecalis* – estudo *in vitro*

Bruna Alexandra Vasconcelos Loureiro

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



Influência da temperatura da irrigação ultrassónica passiva no efeito bactericida do Hipoclorito de Sódio a 5,25% contra a *Enterococcus faecalis* – estudo *in vitro*

Bruna Alexandra Vasconcelos Loureiro
Dissertação orientada pela
Professora Doutora Maria Marise Almeida

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2011

AGRADECIMENTOS

À Doutora Marise Almeida pela simpatia, paciência, ajuda fornecida durante os procedimentos laboratoriais e orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Professor António Ginjeira pela confiança no meu trabalho e orientação durante a realização deste trabalho.

À Doutora Cláudia Martins pelo apoio disponibilizado e conhecimentos transmitidos.

À Doutora Iva Martins pela ajuda fornecida durante os procedimentos laboratoriais.

Aos amigos de turma, em especial à Patrícia Basto e Susana Furão pela amizade, companheirismo, ajuda e conhecimento partilhado.

Ao meu namorado, por me apoiar e ajudar nos momentos mais difíceis e por me proporcionar momentos felizes e de distração.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e amor incondicional. Agradeço pelo incentivo, pelos conselhos, enfim, por serem o meu exemplo de vida.

Restante família e amigos por me apoiarem e ajudarem a seguir em frente.

RESUMO

Introdução: Diversas técnicas de irrigação foram recentemente introduzidas com o intuito de melhorar a desinfecção canalar. O objectivo deste estudo foi comparar a eficácia bactericida (na remoção de *Enterococcus faecalis*) da activação ultrassónica da irrigação final com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 20°C com uma irrigação ultrassónica final com NaOCl 5,25% (m/v) a uma temperatura de 40°C.

Materiais e Métodos: Uma amostra de 46 dentes unirradiculares humanos foi preparada com instrumentos rotativos de Ni-Ti (Protaper). A “*smear layer*” foi removida com ácido cítrico a 10% (m/v). Esterilizaram-se os dentes em autoclave com um ciclo de 15 minutos a 121°C. Cada grupo experimental foi composto por 20 dentes e dois grupos de controlo composto por 3 dentes (positivo e negativo). Inocularam-se os dentes dos grupos experimentais com *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299). Grupo 1: Irrigação ultrassónica com NaOCl a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 20°C; Grupo 2: Irrigação ultrassónica com NaOCl a 5,25 % (m/v) a uma temperatura de 40°C; A desinfecção foi avaliada após 72 h pela turvação de 5 ml de BHI, depois da colheita da amostra com cones de papel.

Resultados: Como o grupo de controlo negativo apresentou crescimento bacteriano, os resultados obtidos não podem ser validados. Contudo, o grupo 1 apresentou 13 tubos sem crescimento e o grupo 2, 24 tubos sem crescimento.

Conclusão: A eficácia bactericida não pode ser aferida, uma vez que os resultados não podem ser validados, devido a uma possível contaminação microbiológica diferente de *Enterococcus faecalis*.

Palavras-chave: Irrigação Ultrassónica, Temperatura, *Enterococcus faecalis*, Hipoclorito de Sódio, Irrigação Final, Insucesso Endodôntico.

ABSTRACT

Introduction: Several irrigation techniques have been recently proposed, with the main objective of improving root canal disinfection. The purpose of this study was to compare the antimicrobial efficacy (in the removal of *Enterococcus faecalis*) of a final flush ultrasonic irrigation with a 5.25% (w/v) solution of sodium hypochlorite (NaOCl) at a temperature of 20°C, with a final flush ultrasonic irrigation with a 5.25% (w/v) solution of sodium hypochlorite (NaOCl) at 40°C.

Materials and Methods: A sample of 46 single-rooted human teeth was prepared using ProTaper NiTi rotary files and 5,25% (w/v) NaOCl. The smear layer was removed with 10% (w/v) citric acid and 5.25% (w/v) NaOCl. The teeth were sterilized in an autoclave for 15 minutes at 121°C. Each experimental group consisted of 20 teeth and two control groups (positive and negative) by 3. The teeth of the experimental groups and positive control were inoculated with *Enterococcus faecalis*. Group 1: Ultrasonic irrigation with 5.25% (w/v) NaOCl at 20°C; Group 2: Ultrasonic irrigation with 5.25% (w/v) NaOCl at 40°C. The disinfection was evaluated by taking the sample with paper points, and then introduced in sterile BHI broth, for 72 hours.

Results: How the negative control group showed bacterial growth, the results cannot be validated. However, the group1 showed 13 tubes without bacterial growth and the group 2 showed 24 tubes without bacterial growth.

Conclusion: The antimicrobial efficacy cannot be comproved because the results cannot be validated, due to the bacterial growth in the negative control tubes.

Keywords: Ultrasonic Irrigation, Temperature, *Enterococcus faecalis*, Sodium Hypochlorite, Final Irrigation, Insucess Endodontics.

ÍNDICE

1. Introdução	1
Anatomia do sistema de canais radiculares.....	1
Microbiologia dos canais radiculares: <i>E. faecalis</i>	1
Preparação químico-mecânica	2
Acção do Hipoclorito de Sódio (NaOCl)	3
Ultra-sons em Medicina Dentária	4
Técnicas de Irrigação Assistida.....	5
2. Objectivos.....	8
Objectivo principal.....	8
Objectivos secundários	8
Hipótese alternativa	8
Hipótese nula	8
3. Materiais e Métodos	9
Preparação da amostra de dentes.....	9
Preparação da suspensão bacteriana.....	10
Inoculação	10
Procedimentos de desinfeção experimental.....	11
Análise da desinfeção experimental	12
Análise estatística.....	12
4. Resultados	13
5. Discussão.....	14
Metodologia experimental	14
Resultados	19
6. Conclusão	23
7. Bibliografia.....	24
8. Anexos.....	30
Anexo I	31
Anexo II	33
Anexo III.....	34

LISTAS DE ABREVIATURAS

UI- Instrumentação Ultrassónica

PUI – Irrigação Ultrassónica Passiva

CHX - Cloroheixidina

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*

G - Gauge

BHI - Brain Heart Infusion

Ni-Ti - Níquel-Titânio

UFC - Unidades formadoras de colónias

MTA - Agregado de trióxido Mineral

JAC - Junção amelocementária

INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico tem como objectivo a limpeza, desinfecção e modelagem do sistema canalar (Townsend *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009) seguidas de obturação e restauração (Sabins *et al.*, 2003; Borin *et al.*, 2007; Munley e Goodell, 2007).

As lesões periapicais devem-se, essencialmente, à presença de microrganismos no sistema canalar radicular (Stuart *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Townsend *et al.*, 2009; Gregorio *et al.*, 2009; Lana *et al.*, 2009). Os produtos provenientes do metabolismo bacteriano são libertados no sistema canalar radicular e difundidos para os tecidos periapicais, causando uma resposta inflamatória (Lin *et al.*, 2007; Brunson *et al.*, 2010). Assim, aos instrumentos compete a excisão de dentina, e às substâncias químicas auxiliares a complementaridade na limpeza e desinfecção (Monteiro *et al.*, 2008; Desai *et al.*, 2009). A colocação de um material obturador e de um material de restauração, logo de seguida, promove o selamento, impedindo a entrada de microrganismos no sistema de canais radiculares, e evita a proliferação de eventuais microrganismos remanescentes (Monteiro *et al.*, 2008; Lana *et al.*, 2009; Gregorio *et al.*, 2009).

Anatomia do sistema de canais radiculares

A anatomia canalar radicular é complexa, apresentando inúmeras ramificações e irregularidades morfológicas, facilitando a colonização bacteriana (Munley e Goodell 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Siu *et al.*, 2010; Miller *et al.* 2010). Os microrganismos podem permanecer nas ramificações e irregularidades do sistema canalar, assim como no interior dos túbulos dentinários. A remoção de remanescentes pulpares, dentinários e de microrganismos no terço apical do canal é considerada o passo mais crítico para o sucesso do tratamento endodôntico (Kahn *et al.*, 1995). Esta complexidade anatômica faz com que a desinfecção completa do sistema canalar permaneça como um desafio para o tratamento endodôntico (Kahn *et al.*, 1995; van der Sluis *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2010).

Microbiologia dos canais radiculares: *E. faecalis*

Vários estudos têm demonstrado que a microbiota das infecções endodônticas é polimicrobiana. O género *Enterococcus* abrange espécies patogénicas, sobretudo

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*), uma das espécies mais comumente encontradas em dentes com infecções endodônticas secundárias ou persistentes (Byström e Sundqvist, 1981; Beber *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2009; Mercade *et al.*, 2009). *E. faecalis* é um coco Gram positivo anaeróbio facultativo, com alto nível de patogenicidade e de difícil erradicação (Beber *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006; Paradella *et al.*, 2007; Giardino *et al.*, 2009) podendo sobreviver isolado ou em biofilme, bem como em monoinfecção (Beber *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006). A sua patogenicidade deve-se aos factores de virulência, que incluem enzimas líticas e factores de resistência demonstrados através da invasão dos túbulos dentinários, da resistência à carência nutricional e da capacidade de manutenção do pH citoplasmático aos níveis ideais, usando uma bomba de prótons, o que lhe permite sobreviver em meios alcalinos (Kayaoglu *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2006; Paradella *et al.*, 2007).

Esta bactéria pode estar associada a diferentes formas de infecção periapical. Nas infecções primárias é encontrada em 4 a 40% dos casos, no entanto, nas infecções periapicais persistentes a sua frequência é muito maior, apresentando uma prevalência de 24% a 77% (Stuart *et al.*, 2006).

Segundo Stuart *et al.* o uso de uma boa técnica asséptica, preparações apicais de maiores dimensões, e o uso de um método de irrigação com NaOCl e clorohexidina (CHX) a 2% (m/v) , constituem os métodos mais efectivos na eliminação da espécie *E. faecalis* do sistema canal (Stuart *et al.*, 2006).

Preparação químico-mecânica

Idealmente, o canal após a preparação químico-mecânica deve apresentar uma forma cônica afunilada e contínua em direcção ao ápex, preservando a forma e curvatura original dos canais e o forame na sua posição espacial original com o menor diâmetro possível facilitando assim, a obturação tridimensional e hermética do canal (Monteiro *et al.*, 2008).

A limpeza do canal radicular depende não só da acção mecânica das limas durante a instrumentação, mas também da acção química das soluções irrigantes (Byström e Sundqvist, 1981; Kahn *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2010) que lubrificam o canal durante a acção de corte dos instrumentos endodônticos, auxiliam na remoção da “smear layer”, e ainda possuem um potencial bactericida e uma acção solvente (Miller *et al.*, 2010).

A importância da utilização de soluções antibacterianas na irrigação do sistema canalar radicular foi reconhecida por Walker, em 1936 (Cameron, 1987). Um dos requisitos mais importantes para uma solução irrigante ideal é a sua capacidade de eliminar os microrganismos e neutralizar as suas toxinas dos canais radiculares (Borin *et al.*, 2007; Karim & Kennedy, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010; van der Sluis *et al.*, 2010).

A sua acção química pode proporcionar um efeito antimicrobiano, a dissolução de tecidos orgânicos e inorgânicos e remoção dos detritos acumulados durante a preparação canalar (Abou-Rass *et al.*, 1981; Borin *et al.*, 2007; Gregorio *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2010; van der Sluis *et al.*, 2010). Além disso, as soluções irrigantes devem ser biocompatíveis com os tecidos da cavidade oral (Borin *et al.*, 2007; Karim & Kennedy, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007).

A eficácia da solução de irrigação pode ser influenciada por vários factores tais como a configuração do sistema canalar, o volume e tipo de irrigante, assim como a pressão de inserção no canal, o calibre e a profundidade de inserção da agulha de irrigação (Kahn *et al.*, 1995).

Alguns estudos referem ainda a importância de uma lavagem final com o irrigante como parte essencial da preparação canalar (Gu *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010). No entanto, para que os objectivos da irrigação sejam cumpridos o tamanho e o alargamento do canal é essencial (Kahn *et al.*, 1995; Nadalin *et al.*, 2009; Rödig *et al.*, 2010).

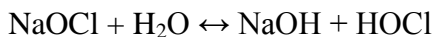
Acção do Hipoclorito de Sódio (NaOCl)

Diversas soluções irrigantes podem ser usadas, no entanto, actualmente, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é talvez o irrigante com uma utilização mais generalizada (Abou-Rass *et al.*, 1981; Borin *et al.*, 2007; Karim e Kennedy, 2007; Mercade *et al.*, 2009). O NaOCl foi produzido pela primeira vez por Berthollet, em França, com o nome de Água de Javel. Durante a primeira guerra mundial Dakin introduziu o NaOCl no tratamento de feridas da guerra (Ribeiro *et al.*, 2010).

A boa aceitação desta solução para irrigação deve-se às suas excelentes propriedades, tais como: amplo espectro microbiano, sendo eficaz contra diversos microrganismos, fungos e vírus, dissolução dos tecidos orgânicos, pH alcalino, baixa tensão superficial e biocompatibilidade tecidual a determinadas concentrações. Ao

contrário de outros irrigantes, o NaOCl demonstrou a capacidade de dissolver tecido necrótico, assim como componentes da “*smear layer*” (Ribeiro *et al.*, 2010).

O NaOCl apresenta um comportamento ácido-base descrito pela seguinte equação:



Equação I - Comportamento ácido-base do NaOCl

O ião hipoclorito reage com a água estabelecendo-se um equilíbrio químico e formando o ácido hipocloroso (HOCl). Este quando em contacto com a matéria orgânica liberta cloro que, combinado com os grupos amina das proteínas, forma cloraminas que interferem com o metabolismo celular. O ácido hipocloroso e os iões hipoclorito (OCl^-) levam à degradação e hidrólise de aminoácidos (Mohammadi *et al.*, 2008; Kandaswamy & Venkateshbabu, 2010; Stojicic *et al.*, 2010). O NaOCl apresenta um pH elevado ($\text{pH} > 11$ - ver equação I) que interfere na integridade da membrana citoplasmática, com inibição enzimática irreversível e alterações no metabolismo celular, conduzindo à lise bacteriana (Estrela *et al.*, 2002; Karim e Kennedy, 2007; Mohammadi *et al.*, 2008; Kandaswamy & Venkateshbabu, 2010; Stojicic *et al.*, 2010).

O seu uso clínico é recomendado a concentrações que variam de 0,5 até 5,25% (m/v), usando-se as soluções isoladamente ou em associação com outros produtos (Lin *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009; Haapasalo *et al.*, 2010) tais como agentes surfactantes, clorohexidina (CHX), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), etc. (Monteiro *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009; Haapasalo *et al.*, 2010).

Em relação à biocompatibilidade da solução de NaOCl, esta, a concentrações entre 0,5 e 1% (m/v) é bem tolerada pelos tecidos no entanto, a concentrações de 5,25% (m/v) provocam danos tecidulares dado que têm sido descritas diversas complicações associadas ao uso de soluções muito concentradas de NaOCl, quando em contacto com os tecidos periapicais (Ribeiro *et al.*, 2010).

Ultra-sons em Medicina Dentária

Desde algumas décadas para cá, que a prática endodôntica tem beneficiado com o desenvolvimento de novas técnicas e novos equipamentos que contribuem para um melhor resultado e uma maior previsibilidade.

As pesquisas iniciais sobre a aplicação do ultra-som em Medicina Dentária iniciaram-se na década de cinquenta. O primeiro trabalho publicado relacionando o ultra-som com a Endodontia foi escrito por Richman em 1957 (Cameron 1987; Sabins *et al.*, 2003; Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009). Em 1980, Martin concebeu uma unidade ultrassónica comercialmente disponível para uso endodôntico (Gu *et al.*, 2009). As unidades ultrassónicas usadas em endodontia apresentam frequências entre 25 a 40 kHz (Plotino *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009).

A utilização do ultra-som em endodontia aumentou a qualidade do tratamento e mostrou-se um importante adjuvante na resolução de casos difíceis. Os defensores dos ultrassons atribuem a sua eficácia a propriedades como a cavitação e agitação acústica (Munley e Goodell 2007; Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Gregorio *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010; van der Sluis *et al.*, 2010). O fenómeno de cavitação consiste na formação de cavidades/bolhas no líquido e o seu subsequente colapso, acompanhado de choques hidráulicos intensos (Anexo I, Figura 1). O efeito da agitação acústica consiste no movimento rápido das partículas da solução irrigante, como que um remoinho à volta da lima (Anexo I, Figura 2) (Munley e Goodell 2007; Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2007; Gregorio *et al.*, 2009; van der Sluis *et al.*, 2010).

Em endodontia os ultrassons podem ser utilizados na obtenção de um melhor acesso e remoção de calcificações; remoção de instrumentos fracturados e obstruções nos canais radiculares; condensação ultrassónica de gutta-percha; colocação de agregado trióxido mineral (MTA); preparação canal, no aumento da acção das soluções irrigantes e cirurgia endodôntica (Plotino *et al.*, 2007).

Técnicas de Irrigação Assistida

Na história da Endodontia, foram empregues esforços contínuos para se desenvolver sistemas de activação dos irrigantes mais eficientes. Estes podem ser divididos em duas categorias principais, técnicas manuais e técnicas mecânicas, dentro destas os vários sistemas de irrigação incluem a irrigação convencional, ultra-sónica e sónica (Anexo I, Figura 3) (Gregorio *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009).

Seringas convencionais com agulhas de vários diâmetros, escovas manuais e agitação com cones de gutta-percha constituem os métodos de irrigação manual. Mais recentemente foram introduzidos novos dispositivos, os sistemas de irrigação sónicos e ultrassónicos (Basrani, 2011).

A irrigação dita convencional, com seringa e agulha, engloba uma seringa onde encaixa uma agulha que pode ter várias formas e calibres. A desinfecção dos canais radiculares por este sistema de irrigação pode ser feita de forma passiva ou através de agitação manual, que consiste em movimentar a agulha para cima e para baixo, no espaço canalar (Gu *et al.*, 2009).

Na literatura são descritos dois tipos de irrigação ultrassónica, a instrumentação ultrassónica (UI) e a irrigação ultrassónica passiva (PUI). O primeiro tipo consiste na combinação simultânea de instrumentação e irrigação ultrassónicas (UI). O segundo tipo é muitas vezes referido como irrigação ultrassónica passiva (PUI), funcionando sem a instrumentação ultrassónica associada, o instrumento endodôntico é colocado dentro do canal sem contactar com as suas paredes (van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009).

A irrigação ultrassónica passiva pode ser executada com uma pequena lima (tamanho 10-20K) (Basrani, 2011).

A PUI consiste num suplemento importante na limpeza do sistema canalar radicular e em comparação com o sistema convencional, com seringa e agulha, contribui para uma melhor remoção de restos orgânicos, inorgânicos e bactérias dos canais radiculares (van der Sluis *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2010).

Podem-se usar dois métodos na PUI, através de um fluxo contínuo do irrigante ou através de um fluxo intermitente com o uso de uma seringa (Gu *et al.*, 2009). Neste último método, o irrigante é injectado no canal radicular com uma seringa e recolocado após cada ciclo de activação ultrassónica. Assim, a quantidade de irrigante que flui através da região apical do canal é controlada, uma vez que a profundidade de penetração da seringa e o volume de irrigante administrados são conhecidos, o que não acontece no método de fluxo contínuo (Gu *et al.*, 2009).

Vários estudos demonstraram que a utilização de um sistema de irrigação contínua no final da instrumentação mecânica, durante 1 minuto, produziu canais significativamente mais limpos (Gu *et al.*, 2009).

O recurso ao método PUI após a instrumentação manual ou mecanizada resulta numa redução significativa do número de bactérias, em comparação com o método de irrigação com seringa ou o método de irrigação sónico (Sabins *et al.*, 2003; van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009). Os resultados positivos com a utilização da PUI podem ser atribuídos a dois factores principais. Ao alto poder dos ultrassons que causam a desintegração dos agregados bacterianos, através da acção de agitação acústica, tornando os biofilmes bacterianos mais susceptíveis à acção bactericida do

NaOCl, e ao efeito de cavitação, que leva a um enfraquecimento da membrana celular, tornando as bactérias mais susceptíveis à acção do NaOCl (van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009; van der Sluis *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de novos estudos clínicos é crucial para perceber a aplicabilidade e vantagens práticas destes novos sistemas de irrigação (Gu *et al.*, 2009). Segundo um estudo de Zou *et al.*, alguns factores como o aumento da concentração, do tempo de exposição e da temperatura do NaOCl, contribuem para uma maior capacidade de dissolução de tecido orgânico e penetração nos túbulos dentinários (Zou *et al.*, 2010).

Assim, tendo em conta que diversos factores podem contribuir para um aumento da eficácia bactericida do NaOCl, foi idealizado este estudo *in vitro*, que pretende comparar a eficácia bactericida de uma irrigação ultrassónica utilizando a solução irrigante (NaOCl), a uma temperatura ambiente de 20°C, com uma irrigação ultrassónica utilizando a solução irrigante (NaOCl), a uma temperatura de 40°C, em dentes monorradiculares infectados com *E. faecalis*.

OBJECTIVOS DO ESTUDO

Objectivo Principal

Observar se uma irrigação ultrassónica com uma solução de Hipoclorito de Sódio (NaOCl) a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 40°C tem uma capacidade bactericida superior que uma irrigação ultrassónica com NaOCl 5,25% (m/v) a uma temperatura de 20°C contra *E. faecalis*.

Objectivos Secundários

- a) Avaliar a eficácia bactericida de uma solução de NaOCl 5,25% (m/v) a uma temperatura ambiente de 20°C, por irrigação ultrassónica, em canais radiculares de dentes infectados com *E. faecalis*.
- b) Avaliar a eficácia bactericida de uma solução de NaOCl 5,25% (m/v), a uma temperatura de 40°C, por irrigação ultrassónica, em canais radiculares de dentes infectados com *E. faecalis*.
- c) Comparar a eficácia bactericida dos procedimentos anteriores.

Hipótese alternativa (H0):

A irrigação com activação ultrassónica ProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation de uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 20 °C nos canais infectados com *E. faecalis*, tem uma eficácia bactericida superior à mesma solução, igualmente activada por ultrassons, mas a uma temperatura de 40 °C.

Hipótese nula (H1):

A irrigação com activação ultrassónica ProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation de uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 40 °C nos canais infectados com *E. faecalis*, tem uma eficácia bactericida igual ou superior à mesma solução, igualmente activada por ultrassons, mas a uma temperatura de 20 °C.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação da amostra de dentes:

Para este estudo foram seleccionados 46 dentes unirradiculares, com um só canal obtidos através da Clínica Externa e de Cirurgia da FMDUL e clínicas privadas de Lisboa. Após a sua extracção os dentes mantiveram-se em água destilada. A sua superfície externa foi limpa com ultrassons (Anexo II, Figura 1) sendo depois os dentes autoclavados (121°C durante 15 minutos). Depois de esterilizados, a coroa dos dentes foi seccionada, ao nível da junção amelocementaria (JAC), com um disco de carbide, colocado numa peça de mão (Anexo II, Figura 2). Verificou-se a permeabilidade e o número de canais em cada dente. Caso não existisse permeabilidade e/ou se verificasse um número superior a um canal na raiz, esses dentes eram excluídos do estudo.

Nos dentes incluídos nos critérios do estudo estabeleceu-se o comprimento canalar de 13mm, e um comprimento de trabalho de 12mm. Para determinar o comprimento de trabalho, introduziu-se uma lima 10K (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) até a ver sair pelo ápex. Recuou-se depois a lima até ao ponto em que não fosse mais vista. Ajustou-se o respectivo *stop* ao topo da raiz, retirou-se a lima e anotou-se o respectivo comprimento (Anexo II, Figura 3). O comprimento de trabalho foi depois estabelecido subtraindo um milímetro a esta medição.

Os dentes que não foram possíveis de permeabilizar, e os de comprimento canalar inferior a 13mm foram excluídos do estudo (Anexo II, Figura 4). Os dentes cujo comprimento canalar foi superior a 13mm foram de novo cortados até se obter este valor.

Instrumentaram-se, em seguida, os dentes. Criou-se uma via de permeabilidade com limas manuais K 10, 15 e 20 (Dentsply-Maillefer, Suíça) antes de se iniciar a instrumentação rotativa. Utilizou-se o sistema de limas rotativas em Níquel-Titânio (Ni-Ti) ProTaper Universal® (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), segundo a sequência recomendada pelo fabricante (S1,Sx,S1,S2,F1,F2,F3). Utilizou-se um motor ATR® (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). Durante a instrumentação, os canais foram irrigados com 0,2 mL de NaOCl a 5,25% (m/v), entre cada instrumento, usando seringa e agulha de saída apical 28G (BD Microlance 3, Becton Dickinson SA, Espanha).

Efectuou-se a eliminação da “*smear layer*”. Para tal, procedeu-se à irrigação com 1mL de ácido cítrico a 10% (m/v) durante 1minuto (min) e irrigação com 1mL de

água destilada durante 30 segundos (s). Seguidamente, secaram-se os canais com cones de papel de diâmetro 30.

Selecionaram-se 2 cores de verniz de unhas. Para cada grupo de dentes do estudo e do controlo, correspondeu aleatoriamente uma cor. Distribuíram-se depois e, também de uma forma aleatória, os dentes pelo grupo experimental e de controlo. Selaram-se os ápices e toda a superfície radicular das raízes com duas camadas do respectivo verniz de unhas, num suporte construído para o efeito.

Os dentes foram acondicionados em embalagens individuais de esterilização e esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15min.

Preparação da suspensão de inoculação:

Foi utilizada uma estirpe de *E. faecalis* (ATCC 51299) crescida inicialmente em meio Slanetz & Bartley (Oxoid, Ltd Basingstoke Hampshire, Inglaterra) (Anexo III, Figural) durante 18 horas a 37°C. Posteriormente as células de *E. faecalis* foram transferidas para meio Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Ltd Basingstoke Hampshire, Inglaterra) e incubadas a 37°C.

Após 24 horas de crescimento, determinou-se a densidade óptica da suspensão a 600 nm num espectrofotómetro Camspec M501 e ajustou-se para uma densidade óptica de 0,5 com meio BHI estéril uma vez que, estudos prévios (Mercade *et al.*, 2009) determinaram que correspondia a 2×10^9 unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. Estes procedimentos foram realizados à chama, de forma a garantir a esterilidade.

Inoculação da suspensão bacteriana:

Cada canal radicular foi inoculado em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar, com 10 µL da suspensão de *E. faecalis* preparada anteriormente, utilizando micropipetas estéreis, à excepção do controlo negativo, que foi inoculado com BHI estéril. Os dentes foram de seguida introduzidos em microtubos estéreis que continham 0,3µL de água destilada esterilizada, colocada previamente com micropipeta estéril, por forma a tornar o ambiente húmido. Incubaram-se a 37°C, durante 48h, em atmosfera húmida confinada, para permitir o crescimento bacteriano.

Procedimentos de desinfecção experimental:

Depois da incubação, os dentes foram irrigados, segundo o padrão de irrigação do respectivo grupo. Todos os procedimentos foram efectuados em condições e com procedimentos assépticos, em câmara de fluxo laminar.

GRUPO 1: Irrigação e activação ultrassónica de NaOCl a 5,25 % (m/v) a 20°C

20 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* foram irrigados com 2,5mL de NaOCl a 5,25% (m/v) a 20°C tendo o irrigante sido activado com ponta de diâmetro 20 (ProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation) colocado na unidade piezo-elétrica (Spartan, USA), com o valor 2 de intensidade da mesma unidade, deixando-se actuar durante 1min. Seguidamente, inactivou-se o NaOCl irrigando com 1mL de tiosulfato de sódio a 5%(m/v) deixando-se actuar durante 1min.

GRUPO 2: Irrigação e activação ultrassónica de NaOCl a 5,25 % (m/v) a 40°C

20 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* foram irrigados com 2,5mL de NaOCl a 5,25%(m/v) a 40°C tendo o irrigante sido activado com ponta de diâmetro 20 (ProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation) colocado na unidade piezo-elétrica (Spartan, USA), com o valor 2 de intensidade da mesma unidade, deixando-se actuar durante 1min. Seguidamente, inactivou-se o NaOCl irrigando com 1mL de tiosulfato de sódio a 5% (m/v) deixando-se actuar durante 1min.

GRUPO 3: Controlo Negativo

Irrigaram-se 3 dentes, que previamente tinham recebido 10 µL com BHI estéril no interior do canal, com 1mL de tiosulfato de sódio a 5%(m/v) e deixou-se actuar durante 1min.

GRUPO 4: Controlo Positivo

Irrigaram-se 3 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* com 1mL de tiosulfato de sódio 5%(m/v) e deixou-se actuar durante 1min.

Em todos os procedimentos de irrigação, os dentes foram irrigados com seringa convencional e agulha esterilizada, 28G com saída apical (BD Microlance 3, Becton Dickinson SA, Espanha).

Análise da desinfecção experimental:

Imediatamente a seguir aos procedimentos de irrigação, foi introduzido um cone de papel esterilizado de diâmetro F3 no canal, procedimento feito em triplicado. Este cone foi, de seguida, introduzido num tubo de ensaio que continha 5mL de BHI estéril. Os tubos contendo os cones foram colocados em estufa, a 37°C, durante 72h, para se avaliar um eventual crescimento bacteriano, dado pela turvação do meio (Anexo II, Figura 5). Deste modo, centrifugou-se a cada 24h de forma a permitir uma difusão do oxigénio, nutrientes e metabolitos.

Análise estatística:

Seleccionou-se o teste qui-quadrado para avaliar eventuais diferenças entre os grupos experimentais com o programa Stat Graphics Plus®. Os valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos ¹.

¹ Pelas razões descritas nos resultados e discussão não foi possível proceder à análise estatística descrita.

RESULTADOS

Todos os grupos de controlo negativo e positivo apresentaram turvação. Deste modo, o nosso estudo não se encontra válido.

A desinfecção obtida para cada grupo experimental está representada na Tabela I e Gráfico I.

Grupo	Tubos com crescimento (%)	Tubos sem crescimento (%)
1	47 (78)	13 (22)
2	36 (60)	24 (40)
3	9 (100)	0 (0)
4	9 (100)	0 (0)

Tabela I – Resultados dos grupos experimentais e respectiva percentagem da desinfecção experimental

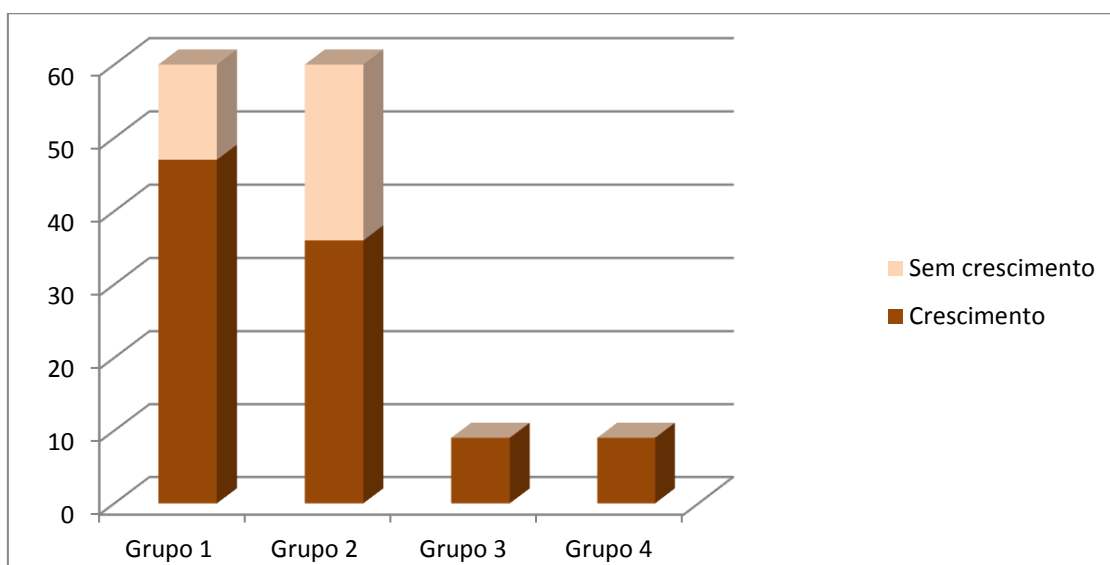


Gráfico I - Resultados da desinfecção bacteriana nos grupos experimentais em número de tubos.

Pelos resultados da desinfecção e assépsia não terem sido validados, não se procedeu à análise estatística.

DISCUSSÃO

Metodologia experimental

A etapa da irrigação no tratamento endodôntico é crucial na desinfecção dos canais radiculares (Gu *et al.*, 2009; Mercade *et al.*, 2009; Townsend *et al.*, 2009). Deste modo, optámos por um estudo microbiano, tendo em conta a importância da desinfecção canalar associada ao sucesso do tratamento endodôntico. No entanto, apesar de todos os esforços por um sistema canalar livre de bactérias, existem ainda evidências que demonstram que as bactérias podem sobreviver em áreas inacessíveis durante a instrumentação, como canais laterais, istmos, delta apicais e túbulos dentinários (Byström e Sundqvist, 1981; Padhye e Vandekar, 2008; Gregorio *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2010). A complexidade anatômica do sistema canalar contribui assim, para que os microrganismos permaneçam em qualquer parte, dificultando a sua remoção (Beber *et al.*, 2006). Deste modo, para o presente estudo, obteve-se uma amostra quantitativa de dentes unirradiculares, com um só canal e sem grandes curvaturas radiculares, com um comprimento de trabalho de 12mm, de modo a uniformizar a amostra e minimizar o efeito desses factores já que deve ser estabelecido um alargamento adequado do canal, de modo a permitir uma correcta irrigação (Gu *et al.*, 2009; Townsend *et al.*, 2009) e eliminação dos microrganismos (Stuart *et al.*, 2006). Deste modo, de acordo com o estudo efectuado por Townsend *et al.* (2009) e de maneira a permitir um livre movimento do irrigante, os dentes neste estudo foram preparados até uma preparação apical de diâmetro 0,30mm (F3), procedimento igualmente seguido por Mercade *et al.* (Mercade *et al.* 2009).

O *E. faecalis* tem sido usado em diversos estudos de avaliação de soluções de irrigação e medicação intracanal, (Beber *et al.*, 2006; Mercade *et al.*, 2009; Williamsom *et al.*, 2009) sobretudo devido ao seu alto nível de resistência a agentes antimicrobianos (Beber *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2009), à sua capacidade de sobrevivência no sistema canalar mesmo na ausência de outros microrganismos, e à sua capacidade de crescimento em condições laboratoriais (Siqueira *et al.*, 2002; Mercade *et al.*, 2009). Deste modo, a bactéria seleccionada foi a *E. faecalis*.

Outras espécies bacterianas comumente associadas à infecção endodôntica, necessitariam de um suporte simbiótico de outra bactéria, enquanto que, o *E. faecalis* sobrevive bem em monocultura. Adicionalmente, esta espécie possui uma grande

importância clínica devido à sua relativa resistência aos procedimentos químico-mecânicos.

Introduziram-se 10 μ L, com base em estudos prévios de concentração da suspensão bacteriana, e desta forma inoculou-se aproximadamente 2x10⁹ UFC/mL, o que está entre os valores de concentração bacteriana encontrados em dentes infectados. Os dentes foram deixados em atmosfera húmida e confinada e colocados em estufa durante 48h para permitir o crescimento bacteriano tal como no estudo de Mercade *et al.* (2009), tempo demonstrado como suficiente por Distel *et al.* (2002).

Após os procedimentos de irrigação, efectuou-se a recolha de amostras para cultura bacteriológica pelo método de cones de papel, tal como efectuado em vários estudos (Berber *et al.*, 2006; Mercade *et al.*, 2009). Foram utilizados 3 cones de papel por dente, de modo a evitar resultados positivos por má manipulação ou contaminação. Cada cone de papel foi colocado em meio de cultura líquido e o crescimento bacteriano foi verificado às 72h, através da turvação do meio, procedimento utilizado por Mercade *et al.* (2009) no seu estudo.

O NaOCl apesar de se apresentar como a solução de irrigação mais usada, não consegue dissolver matéria inorgânica, não contribuindo assim para a remoção da “smear layer” formada durante a instrumentação mecânica (Zehnder 2006). Apesar de existir alguma controvérsia sobre se esta deve ou não ser removida, sabe-se que a presença de restos dentinários reduz o efeito dos medicamentos e irrigantes endodonticos (Haapasalo e tal., 2000). Alguns estudos relatam a utilização alternada do NaOCl com soluções quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% (m/v) ou o ácido cítrico 10% (m/v) (Suart *et al.*, 2006; Zehnder, 2006) na remoção da “smear layer”. Sendo agentes quelantes formam compostos de coordenação com o cálcio da hidroxiapatite, quer do esmalte quer da dentina, ajudando assim a remover a componente inorgânica e actuando em sinergia com o ião hipoclorito responsável pela remoção da parte orgânica (Suart *et al.*, 2006; Zehnder, 2006; Gu *et al.*, 2009). O ácido cítrico pode ser em concentrações desde 1% a 50% (m/v), sendo mais frequentemente usado a 10% (m/v). Este é aplicado no canal radicular, após a instrumentação mecânica, deixando-se actuar durante 1 a 3min (Lin *et al.*, 2007; Haapasalo *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados, no que diz respeito à eficiência na remoção da “smear layer”, para o ácido cítrico a 10% (m/v) e o EDTA a 17% (m/v) são semelhantes (Zehnder, 2006; Kandaswamy e Venkateshbabu, 2010; Basrani, 2011). No

nosso estudo foi utilizado ácido cítrico a 10% (m/v) durante 1 minuto (min) pois segundo a literatura, apresenta eficácia semelhante ao EDTA (Sabins *et al.*, 2003; Basrani, 2011), sendo mais fácil de adquirir e menos dispendioso (Sabins *et al.*, 2003). Segundo Zehnder o ácido cítrico é eficaz na remoção da “*smear layer*”, devendo actuar no canal pelo menos 1min (Zehnder, 2006).

Todos os ápices dos dentes foram selados. A aplicação do verniz de unhas foi também feita em toda a superfície externa das raízes, tal como Haapasalo e Ørstavik (1987) no seu estudo, de modo a ocluir, os túbulos dentinários abertos nesta superfície, em eventuais áreas desprovidas de cimento. Tentámos assim, prevenir a contaminação através da superfície externa do dente durante os procedimentos laboratoriais e criar uma semelhança exacta com a situação clínica (Gregorio *et al.*, 2010).

Ao selarmos o foramen apical, vamos também simular o que ocorre clinicamente nos canais, por um fenómeno designado de *vapor lock* (Gregorio *et al.*, 2009). Isto pode ser descrito como o encarceramento de ar provocado pelo avanço de um líquido em direcção a um canal estreito, impedindo a progressão dos irrigantes (Gregorio *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009) e o contacto destes com as paredes radiculares (Gu *et al.*, 2009).

A garantia de assépsia durante todo o procedimento experimental e após a remoção da “*smear layer*” foi fundamental, de modo a evitar qualquer contaminação bacteriana. Os dentes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15min, valores seguidos por Vinothkumar *et al.* (2007).

A solução de irrigação utilizada na preparação químico-mecânica do sistema canal, mostra-se como uma variável importante no tratamento endodôntico. Gregorio *et al.* estabeleceu que a instrumentação mecânica seguida de um sistema de irrigação com uma solução salina não elimina eficazmente os microrganismos do sistema canal, sendo necessário o recurso a soluções irrigantes com propriedades antimicrobianas, tal como o NaOCl (Byström & Sundqvist, 1981; Gregorio *et al.*, 2009; Williamsom *et al.*, 2009). Neste contexto, o NaOCl assume-se como o irrigante principal (Mercade *et al.*, 2009), sendo que a concentração empregada na prática clínica varia de 0,5 a 5,25% (m/v) (Ribeiro *et al.*, 2010; Basrani, 2011).

O NaOCl é um dos irrigantes mais estudado e utilizado em endodontia, devido à sua elevada capacidade bactericida, lubrificante e solvente, (Mercade *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2010) e por isso foi o irrigante escolhido para os

nossos ensaios. A concentração utilizada foi de 5,25% (m/v) porque se sabe que concentrações inferiores têm efeitos antimicrobianos igualmente inferiores (Abou-Rass *et al.*, 1981; Beber *et al.*, 2006; Giardino *et al.*, 2009).

Segundo um estudo realizado por Berber *et al.*, uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) apresenta uma melhor actividade antibacteriana contra *E. faecalis* do que uma solução de NaOCl a concentrações inferiores. Nesse estudo avaliou-se a eficácia do NaOCl a 0,5%, 2,5% e 5,25% (m/v), com instrumentação manual e mecânica em dentes inoculados com *E. faecalis* (Beber *et al.*, 2006).

No entanto, concentrações elevadas são potencialmente tóxicas para os tecidos periapicais (Stojicic *et al.*, 2010), devemos, por isso, ter sempre em conta a sua toxicidade (Gernhardt *et al.*, 2004; Noites *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010). As complicações associadas ao uso de soluções concentradas de NaOCl surjem como hematoma, edema, dor intensa, parestesia, hiperestesia, e necrose tecidular (Ribeiro *et al.*, 2010).

A inactivação do NaOCl com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 5% (m/v) durante 1 minuto foi importante porque permitiu padronizar o tempo de actuação do NaOCl nos dois grupos experimentais (Radcliffe *et al.* 2004; Mercade *et al.*, 2009). O calibre da agulha utilizado em todos os grupos experimentais foi 30G, por permitir uma boa profundidade de penetração nos canais radiculares e ainda uma segura distribuição do irrigante às regiões apicais. Sendo por isso, utilizada com relativa segurança na prática clínica.

Segundo um estudo de Paragliola *et al.*, o uso de um sistema de agitação aumenta a efectividade do procedimento de lavagem final no terço apical do canal (Paragliola *et al.*, 2010). A única maneira de um irrigante se mostrar eficaz é através do movimento contínuo da solução irrigante no interior dos canais. Os ultrassons são um suplemento útil na limpeza dos canais radiculares. Um irrigante em conjunto com a vibração ultrassónica, gera um movimento contínuo desse irrigante, aumentando assim a eficácia de limpeza do canal radicular (Plotino *et al.*, 2007; Gregorio *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010; van der Sluis *et al.*, 2010).

Novos sistemas e dispositivos foram propostos para aumentar o fluxo e distribuição das soluções de irrigação no sistema canalar. Esses novos sistemas podem ser divididos em duas grandes categorias, técnicas de agitação manuais e dispositivos de agitação mecânica (Basrani, 2011). A PUI tem demonstrado bons resultados na limpeza

e desinfecção do sistema canalar em comparação com as técnicas manuais (Sabins *et al.*, 2003; van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009). A agitação ultrassónica promove um maior fluxo, e maior renovação do irrigante dentro do canal, promovendo assim uma maior limpeza, mas também um maior efeito bactericida, através dos fenómenos conhecidos como agitação acústica e cavitação (Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2010). Na PUI não há qualquer instrumentação ou contacto com as paredes do canal por parte do dispositivo de irrigação. As pontas ultrassónicas utilizadas para este tipo de irrigação devem ser de reduzido diâmetro, 15K ou 20K, para que o movimento seja livre e passivo (van der Sluis *et al.*, 2010), evitando assim o contacto com as paredes canulares e consequente formação de “smear-layer” (Sabins *et al.*, 2003; van der Sluis *et al.*, 2007). Quando uma ponta de maior calibre (tamanho 25) é utilizada, o movimento produzido é menor, uma vez que a ponta só se move livremente na porção mais coronal do canal (van der Sluis *et al.*, 2007). A ponta ultrasónica utilizada no nosso estudo foi a 20 K, com o intuito de não provocar alterações no canal radicular.

Há um efeito sinérgico entre o NaOCl e a acção ultrassónica (Plotino *et al.*, 2007). O tempo de activação ultrassónica do NaOCl no nosso estudo foi de 1 minuto, tal como muitos estudos de irrigação ultrassónica mostraram ser eficaz (Sabins *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2009). Além disso, clinicamente, um período de activação do irrigante de 1 minuto é aceitável. Como a colocação do volume estipulado de NaOCl (2,5mL), não demorou 1 minuto, mantivemos nos 30 segundos restantes, a ponta ultrassónica a vibrar. Esta opção permitiu padronizar o volume de irrigante e o tempo de activação entre os grupos experimentais.

Existem dois tipos de activação descritos na irrigação ultrassónica passiva (PUI): contínua (a activação ocorre ao mesmo tempo que o irrigante é colocado continuamente no canal) e intermitente (o irrigante é activado após a sua colocação no canal) (Gu *et al.*, 2009). No nosso estudo usamos o método de irrigação ultrassónica contínuo.

Após os procedimentos de irrigação ultrassónica, a análise da desinfecção foi efectuada usando cones de papel esterilizados. Este método é muito usado na recolha de amostras microbiológicas do sistema canalar em endodontia, sendo mais eficaz em canais húmidos. Por este motivo a recolha da amostra bacteriana foi efectuada logo após os procedimentos de irrigação final e em triplicado para diminuir a possibilidade de contaminação por má manipulação. A avaliação do crescimento bacteriano foi efectuada

pela turvação do meio de BHI estéril nos tubos onde foram colocados os cones de papel, sendo realizada após 72h, tal como Mercade *et al.* (2009).

Resultados

O controlo positivo efectuado teve como objectivo garantir que as bactérias inoculadas se encontravam viáveis em todos os procedimentos experimentais, e que a solução inactivadora do NaOCl não tinha por si efeito bactericida. O controlo negativo efectuado, ao não se inocular com bactérias os seus dentes, teve como objectivo garantir a esterilidade dos procedimentos.

Quando se procedeu à observação dos resultados após as 72h, verificámos que os controlos negativos apresentavam turvação do meio, isto é, com crescimento bacteriano. Sendo assim, não conseguimos comprovar a eficácia dos protocolos de esterilização e assépsia, não garantindo a validade dos nossos resultados.

Deste modo, realizámos novamente todos os ensaios laboratoriais, após limpeza e desinfecção dos dentes previamente inoculados, com um volume abundante de NaOCl a 5,25% (m/v) e de água destilada. Verificámos a selagem do ápex e superfície radicular, voltando a recobrir os mesmos com uma camada de verniz. Após a secagem destes ao ar livre, realizámos um novo ciclo em autoclave a 121°C durante 15min, em embalagens individuais.

No novo ensaio realizado, não se alterou em nada a metodologia, no entanto, todos os tubos apresentaram turvação, incluindo os controlos positivos e negativos, tal como o frasco de BHI estéril, apenas aberto na câmara de fluxo laminar. Surgiram-nos 3 tipos de aparência nos tubos: sem turvação, indicativos de ausência de qualquer microrganismo; com turvação, indicativos de crescimento bacteriano com a *E. faecalis*; e turvação com uma camada espessa e esbranquiçada à superfície do meio, indicativos do crescimento de um microrganismo diferente de *E. faecalis* (Anexo II, figura 5).

Como todos os materiais utilizados foram devidamente esterilizados e todo o protocolo experimental foi efectuado de acordo com os procedimentos correctos, as causas possíveis para a contaminação podem dever-se a erro de manipulação do material durante os procedimentos, ou contaminação da câmara de fluxo laminar.

Como não foi possível proceder a uma nova repetição do estudo numa câmara que nos garantisse as condições de assépsia, por falta de tempo e recursos, estes resultados não apresentam qualquer validade e por isso o estudo deve ser repetido.

Vários factores foram relatados como podendo influenciar a efectividade das soluções irrigantes na limpeza dos canais radiculares, podendo aumentar a dissolução dos tecidos orgânicos (Nadalin *et al.*, 2009). Está demonstrado que a capacidade de dissolução tecidular do NaOCl depende de inúmeros factores, nomeadamente a concentração, tempo, volume, pH, temperatura e agitação (Stojicic *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2010).

Embora exista um consenso geral de que o aumento da temperatura do NaOCl aumenta a sua efectividade, existem poucos artigos publicados sobre o assunto (Stojicic *et al.*, 2010). Deste modo, como o factor temperatura é uma variável facilmente manipulável, (não implica grandes recursos ou despesas), ainda pouco estudada e parece potenciar o efeito antimicrobiano da solução de NaOCl, é esta a variável avaliada no presente estudo.

O colagénio bacteriano é oxidado pelo NaOCl e, simultaneamente o aumento da temperatura conduz a uma desnaturação proteica, assim o aumento da temperatura do irrigante produzido pela acção ultrassónica desempenha um papel importante na eliminação bacteriana (Zehnder, 2006; Plotino *et al.*, 2007). No entanto, existe um efeito do ultrassom directamente associado à limpeza do canal, independentemente desse aumento da temperatura originado pelo ultrassom (Zehnder, 2006). Neste estudo o aumento da temperatura inerente à irrigação ultrassónica não é avaliado nem interfere com o resultado do nosso estudo, uma vez que, estamos a comparar dois grupos experimentais utilizando, em ambos, o mesmo sistema de irrigação ultrassónica assim, os resultados dever-se-ão exclusivamente ao efeito do pré-aquecimento da solução de NaOCl e não ao aumento da temperatura inerente à irrigação ultrassónica.

No nosso estudo utilizou-se uma temperatura de 40°C por ser uma temperatura próxima da temperatura corporal (37°C) que, associada ao uso do dique de borracha, não acarreta tanto risco para o paciente na prática clínica.

Analizando os resultados obtidos no primeiro ensaio laboratorial, podemos verificar que o pré-aquecimento da solução de NaOCl 5,25% (m/v) a 40°C aumenta o seu efeito bactericida contra *E. faecalis*. Estes resultados estão em conformidade com outros estudos (Sirtes *et al.*, 2005; Zehnder *et al.*, 2006). Segundo Stojicic *et al.* o pré-

aquecimento de soluções de NaOCl a baixa concentração melhora a sua capacidade de dissolução tecidual, sem qualquer efeito na sua estabilidade, a curto prazo. Também, a toxicidade de soluções de NaOCl aquecidas, é inferior em relação a soluções com elevada concentração, a temperaturas mais baixas, com igual eficácia (Stojicic *et al.*, 2010).

Sirtes e Zehnder concluíram que o pré-aquecimento das soluções de NaOCl a 5,25% (20 °C, 45 °C e 60 °C) aumenta a sua eficácia contra o *E. faecalis* utilizando o método de cultura (Sirtes *et al.*, 2005; Zehnder *et al.*, 2006). Ainda Sirtes *et al.* demonstrou que soluções de NaOCl a 1%, 2,62%, e 5,25% (m/v) mantinham a sua quantidade de cloro inalterada durante todo o período experimental, que correspondeu a 1 hora, a 20°C, 45°C e 60°C (Sirtes *et al.* 2005). De igual modo, neste estudo, em cada um dos grupos experimentais todos os procedimentos foram executadas em menos de 1 hora, excluindo assim a possibilidade da diminuição da eficácia do NaOCl durante o protocolo experimental a temperaturas de 40°C.

Siqueira *et al.* estudou a dissolução de fragmentos de tecido pulpar bovino pelo NaOCl a diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2,5% e 5% (m/v)), temperaturas (27 °C e 37 °C) e valores de pH (7,0; 9,0 e 11,0) e pela CHX a 2% (m/v) e observou que o factor que exerce maior influência sobre a dissolução pelo NaOCl, é o pH da solução, seguido da temperatura e, por último, a concentração. Foi demonstrado que um aumento da temperatura promovia um maior aumento da velocidade de dissolução em comparação com a variação da concentração (Siqueira *et al.*, 2005).

Num estudo realizado por Zou *et al.*, avaliou-se a capacidade de penetração de uma solução de NaOCl nos túbulos dentinários, de acordo com a sua concentração, temperatura e tempo de contacto com a superfície canalar. Foi demonstrado que a capacidade de dissolução de uma solução de NaOCl 1%(m/v) a 45°C era igual a uma solução de NaOCl 5,25% (m/v) a 20°C (Zou *et al.*, 2010).

Segundo Basrani o aumento da temperatura melhora significativamente o efeito antimicrobiano do NaOCl (Basrani, 2011). Estudos sobre dissolução tecidual como os de Abou-Rass e Oglesby e Siqueira *et al.*, mostraram que a temperatura exerce grande influência sobre a actividade do NaOCl, independentemente da concentração utilizada (Abou-Rass e Oglesby 1981; Siqueira *et al.*, 2005).

O nosso estudo é um estudo piloto e como tal limitado. Os resultados observados deverão ser testados com uma amostra maior e nas devidas condições de assépsia. No

entanto, a pouca quantidade de estudos que comparam a eficácia bactericida da técnica de irrigação ultrassônica contínua a diferentes temperaturas de uma solução de NaOCl tornam relevante este estudo.

Seria interessante a realização de mais estudos em que se associem diversas variáveis que potenciam o efeito antimicrobiano do NaOCl, tais como a variação do volume, pH, concentração, temperatura, associação com outros produtos, etc.

Poder-se-ia também recorrer a um método de irrigação manual em vez da irrigação ultrassônica, uma vez que a irrigação ultrassônica já por si leva a um aumento da temperatura e além disso, trata-se ainda de um sistema dispendioso e pouco utilizado pela maioria dos endodontistas.

Além disso, será necessário refazer um novo ensaio, após confirmação da contaminação ou não da câmara de fluxo laminar.

CONCLUSÃO

No nosso estudo não foi possível verificar se as hipóteses propostas estavam correctas, uma vez que será necessária a realização de novas experiências para validação dos resultados, após solução do problema de asséptia observado.

Todavia, podemos, para já, ainda de uma forma preliminar, afirmar que estes resultados indiciam que uma irrigação ultrassónica com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 40°C apresenta um efeito bactericida superior a uma irrigação ultrassónica com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 20°C contra *Enterococcus faecalis*, demonstrando assim, vantagem para a prática clínica, uma vez que não representa um custo acrescido no tratamento endodôntico e é fácil de executar.

Objectivos Secundários

- a) A solução de NaOCl 5,25% (m/v) a uma temperatura ambiente de 20°C, por irrigação ultrassónica, em canais radiculares de dentes infectados com *E. faecalis* apresentou 13 microtubos, num total de 60, sem crescimento bacteriano.
- b) A solução de NaOCl 5,25% (m/v) a uma temperatura ambiente de 40°C, por irrigação ultrassónica, em canais radiculares de dentes infectados com *E. faecalis* apresentou 24 microtubos, num total de 60, sem crescimento bacteriano.
- c) Uma irrigação ultrassónica com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 40°C apresenta um efeito bactericida superior a uma irrigação ultrassónica com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) a uma temperatura de 20°C contra *Enterococcus faecalis*.

BIBLIOGRAFIA

1. Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J Endod*. 1981;7(8):376-7.
2. Ávila L, Santos M, Siqueira E, Nicoletti M, Bombana A. Evaluation of sodium hypochlorite solutions used by endodontists. *Rev Sul-Bras Odontol*. 2010;7(4):396-400.
3. Basrani B. Endodontic Irrigation. *Oral Health*. 2011;101(5):12-18.
4. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J*. 2006;39(1):10-17.
5. Borin G, Becker A, Oliveira E. A história do hipoclorito de sódio e a sua importância como substância auxiliar no preparo químico mecânico de canais radiculares. *Revista de Endodontia Pesquisa e Ensino On Line*. 2007;3(5):1-5.
6. Brunson M, Heilborn C, Johson DJ, Cohenca N. Effect of Apical Preparation Size and Preparation Taper on Irrigant Volume Delivered by Using Negative Pressure Irrigation System. *J Endod*. 2010;36(4):721-4.
7. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981 Aug;89(4):321-8.
8. Cameron JA. The synergistic relationship between ultrasound and sodium hypochlorite: a scanning electron microscope evaluation. *J Endod*. 1987;13(11):541-5.
9. Desai P, Himel V. Comparative Safety of Various Intracanal Irrigation Systems. *J Endod*. 2009;35(4):545-9.

10. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002 Oct;28(10):689-93.
11. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.
12. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J.* 2004 Apr;37(4):272-80.
13. Giardino L, Savoldi E, Ambu E, Rimondini R, Palezona A, Debbia EA. Antimicrobial effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid, and sodium hypochlorite on three common endodontic pathogens. *Indian Journal of Dental Reseach.* 2009;20(3):391.
14. Gregorio CD, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. Effect of EDTA , Sonic , and Ultrasonic Activation on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals : An In Vitro Study. *J Endod.* 2009;35(6):891-5.
15. Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of Different Irrigation and Activation Systems on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals and up to Working Length: An In Vitro Study. *J Endod.* 2010 Jul;36(7):1216-21.
16. Gu L, Kim JR, Ling J, *et al.* Review of Contemporary Irrigant Agitation Techniques and Devices. *J Endod.* 2009;35(6):791-804.
17. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987 Aug;66(8):1375-9.
18. Jiang L, Verhaagen B, Versluis M, van der Sluis LW. Influence of the Oscillation Direction of an Ultrasonic File on the Cleaning Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation. *J Endod.* 2010;36(8):1372-6.

19. Kahn FH, Rosenberg PA, Gliksberg J. An In Vitro Evaluation of the Irrigating Characteristics of Ultrasonic and Subsonic Handpieces and Irrigating Needles and Probes. *Journal of Endodontics*. 1995;21(5):277-280.
20. Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *Journal of Conservative Dentistry*. 2010;13(4):256-264.
21. Karim E, Kennedy J. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103:560-9.
22. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004;15(5):308-320.
23. Lana PE, Scleza MF, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Júnior RH. Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide Pastes on Enterococcus faecalis Cultivated in Root Canal Systems. *Braz Dent J*. 2009;20(1):32-6.
24. Lin LM, Lin J, Rosenberg PA. One-appointment endodontic therapy Biological considerations. *J Am Dent Assoc*. 2007;138:1456-1462.
25. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(2):295-8.
26. Miller TA, Baumgartner JC. Comparison of the Antimicrobial Efficacy of Irrigation Using the EndoVac to Endodontic Needle Delivery. *J Endod*. 2010;36(3):509-511.
27. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008 Dec;58(6):329-41.
28. Monteiro PG, Bombana A, Santos MD, Zaragoza RA. Análise da limpeza dentinária em canais radiculares preparados com um sistema rotatório e diferentes substâncias químicas. *RGO*. 2008;56(1):7-15.

29. Munley PJ, Goodell GG. Comparison of Passive Ultrasonic Debridement Between Fluted and Nonfluted Instruments in Root Canals. J Endod. 2007;33(5):578-80.
30. Nadalin MR, Perez DE, Vansan LP, *et al.* Effectiveness of Different Final Irrigation Protocols in Removing Debris in Flattened Root Canals. Braz Dent J. 2009;20(3):211-4.
31. Noites R, Carvalho M F, Vaz I P. Complicações que podem surgir durante o Uso do Hipoclorito de Sódio no Tratamento Endodôntico. Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial. 2009;50(1).
32. Padhye L, Vandekar M. The comparison of the antimicrobial effects of three endodontic irrigants on enterococcus faecalis - An In Vitro Study. Scientific Journal. 2008;2.
33. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AO. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. Revista de Odontologia da UNESP. 2007;36(2):163-68.
34. Paragliola R, Franco V, Fabiani C, Mazzoni A, Nato F, Tay R F, Breschi L, Grandini S. Final Rinse Optimization: Influence of Different Agitation Protocols. J Endod. 2010;36(2):282–285.
35. Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in Endodontics: A Review of the Literature. J Endod. 2007;33(2):81-95.
36. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2004 Jul;37(7):438-46
37. Ribeiro E, Santos M, Siqueira E, Nicoletti M. Sodium Hypochlorite in Endodontics. Braz J Health. 2010;(1):54-62.

38. Rödíg T, Bozkurt M, Konietschke F, Hülsmann M. Comparison of the Vibringe System with Syringe and Passive Ultrasonic Irrigation in Removing Debris from Simulated Root Canal Irregularities. *J Endod.* 2010;36(8):1410-3.
39. Sabins RA, Johnson JD, Hellstein JW. A comparison of the cleaning efficacy of short-term sonic and ultrasonic passive irrigation after hand instrumentation in molar root canals. *J Endod.* 2003;29(10):674-8.
40. Shen Y, Gao Y, Qian W, *et al.* Three-dimensional Numeric Simulation of Root Canal Irrigant Flow with Different Irrigation Needles. *J Endod.* 2010;36(5):884-9.
41. Siqueira JF, Rôças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhães FAC, Uzeda M. Efficacy of Instrumentation Techniques and Irrigation Regimes in Reducing the Bacterial Population within Root canals. *J Endod.* 2002;28(3):181-4.
42. Siqueira EL, Santos M, Bombana AC. Dissolução de tecido pulpar bovino por duas substâncias químicas do preparo do canal radicular. *RPG Rev Pos-Grad* 2005; 12(3):316-22.
43. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle, Zehnder M The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod* 2005; 31(9):669-71.
44. Siu C, Baumgartner JC. Comparison of the Debridement Efficacy of the EndoVac Irrigation System and Conventional Needle Root Canal Irrigation In Vivo. *J Endod.* 2010;36(11):1782-1785.
45. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue Dissolution by Sodium Hypochlorite: Effect of Concentration, Temperature, Agitation, and Surfactant. *JOE.* 2010;36(9):1558-1562.
46. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32(2):93-8.

47. Townsend C, Maki J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. *J Endod.* 2009;35(7):1040-3.
48. Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(6):555-9.
49. van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *International Endodontic Journal.* 2007;40:415-26.
50. van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the Influence of Refreshment/Activation Cycles and Irrigants on Mechanical Cleaning Efficiency During Ultrasonic Activation of the Irrigant. *J Endod.* 2010;36(4):737-40.
51. Williamsom E A, Cardon W J, DDS, Drake R D. Antimicrobial Susceptibility of Monoculture Biofilms of a Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*. *JOE.* 2009;35(1):95-97.
52. Zehnder M. Root canals irrigants. *J Endod* 2006;32(5):389-98.
53. Zeltner M, Peters OA, Paqué F. Temperature Changes During Ultrasonic Irrigation with Different Inserts and Modes of Activation. *J Endod.* 2009; 35(4):573-7.
54. Zou L, Shen Y, Li W, Haapasalo M. Penetration of Sodium Hypochlorite into Dentin. *JOE.* 2010;36(5):793-796.
55. Vinothkumar TS, Kavitha S, Lakshminarayanan L, Gomathi NS, Kumar V. Influence of irrigating needle-tip designs in removing bacteria inoculated into instrumented root canals measured using single-tube luminometer. *J Endod.* 2007 Jun;33(6):746-8.

ANEXOS

Anexo I

Figura 1 – Agitação acústica em torno de uma lima em água (esquerda) e vista esquemática (direita).

Figura 2 - Fenómeno de cavitação produzido por uma lima no início da activação ultrassónica (esquerda) e a alta rotação (direita).

Figura 3 - Resumo dos sistemas de irrigação utilizados em Endodontia.

Anexo II

Figura 1 – Destartarização dos dentes

Figura 2 – Corte dos dentes pela junção amelocementária com disco de carbono

Figura 3 – Verificação do comprimento radicular dos dentes

Figura 4 – Dentes excluídos do estudo

Figura 5 – Observação da turvação do meio. Da esquerda para direita: sem turvação, com turvação e com contaminação.

Anexo III

Figura 1 – Unidades formadoras de colónias (UFC)/mL de *Enterococcus faecalis* em meio Slanetz & Bartley Colónias

Anexo I

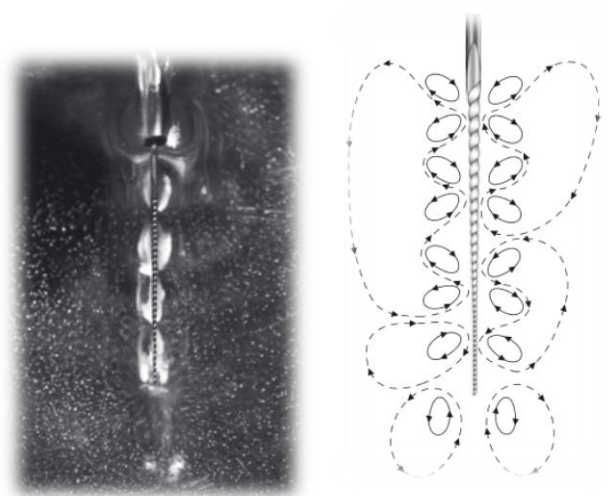


Figura 1 – Agitação acústica em torno de uma lima em água (esquerda) e vista esquemática (direita). Imagens reproduzidas de van der Sluis *et al*, 2007.



Figura 2 – Fenómeno de cavitação produzido por uma lima no início da activação ultrassónica (esquerda) e a alta rotação (direita). Imagens reproduzidas de van der Sluis *et al*, 2007.

Anexo I

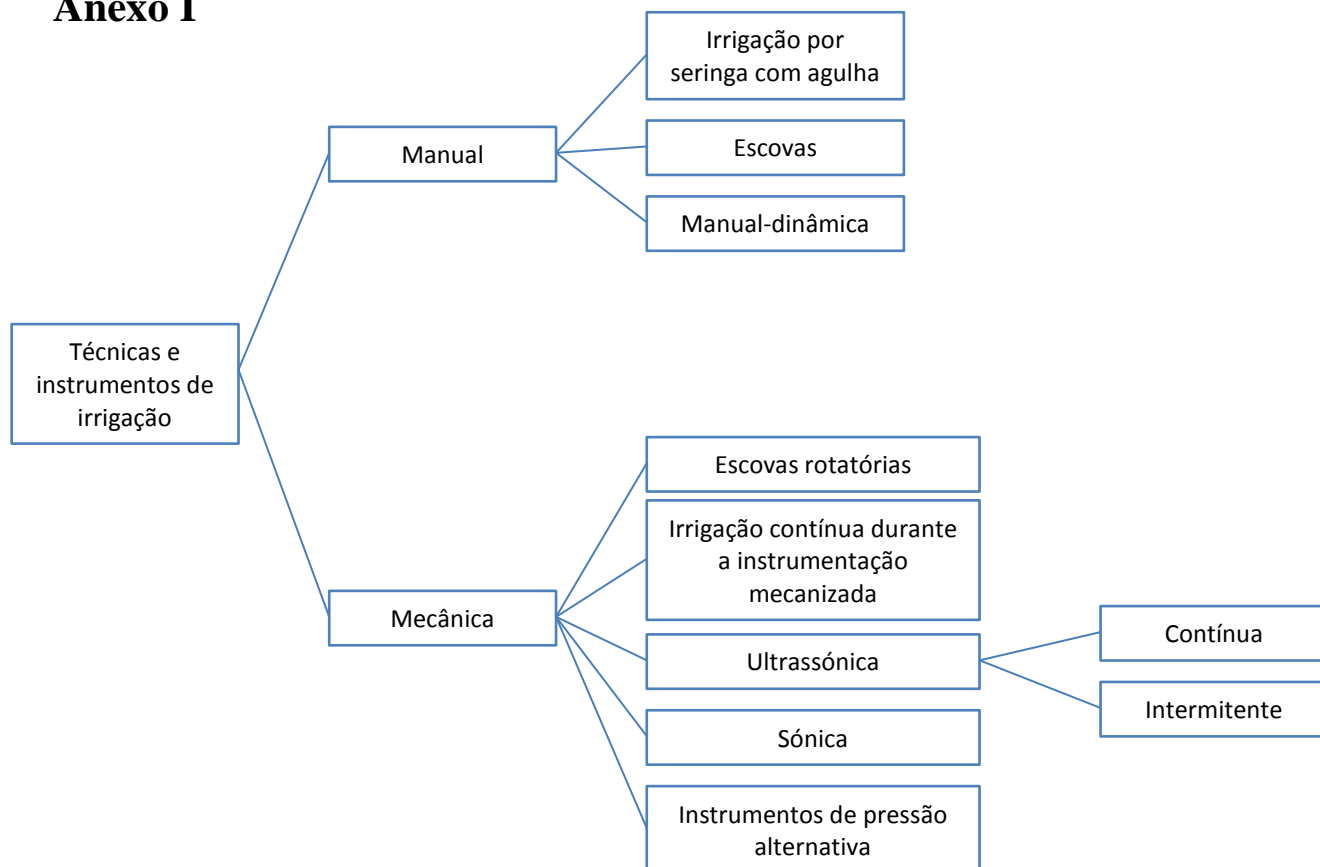


Figura 3 – Resumo dos sistemas de irrigação utilizados em endodontia. Esquema adaptado de Gu *et al.*, 2009.

Anexo II



Figura 1 – Destartarização dos dentes



Figura 2 – Corte dos dentes pela junção amelocementária com disco de carbono

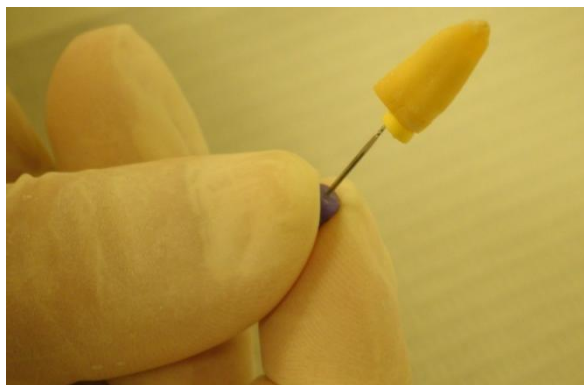


Figura 3 – Verificação do comprimento radicular dos dentes



Figura 4 – Dentes excluídos do estudo

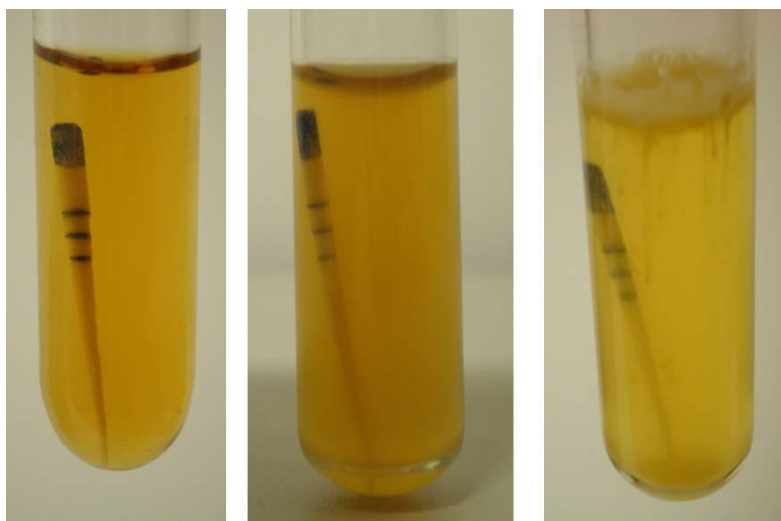


Figura 5 – Observação da turvação do meio. Da esquerda para direita: sem turvação, turvo e com contaminação

Anexo III

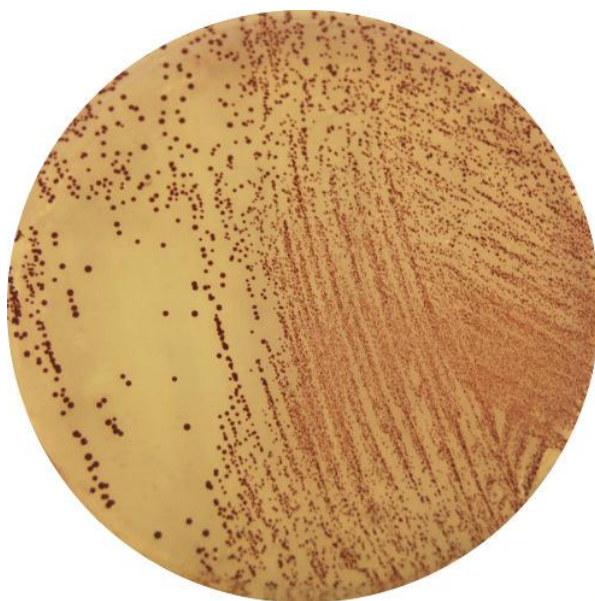


Figura 1 – Unidades formadoras de colónias (UFC)/mL de *Enterococcus faecalis* em meio Slanetz & Bartley